

전분당 부산물로부터 유기산 생산 및 농축에 관한 연구 :

I. 유기산 균주 *Propionibacterium acidipropionici*의 발효 특성

진선자, 최철호, 주윤상, 이의상*

관동대학교 환경공학과 생물공정연구실, 상명대학교 환경공학과*

전화 (0396) 670-3357, FAX (0396) 670-3369

Abstract

The main objectives of the study were to find optimum fermentation conditions of *Propionibacterium acidipropionici* for the production of organic acids. Three strains of *Propionibacterium acidipropionici* were selected for batch fermentation. Nutrients and environmental conditions on cell growth were defined by series of experiments. The optimum conditions of peptone, yeast extract, pH were determined to be 1.5%, 0.75%, 5.5~7.5, respectively. Among the strains of *P. acidipropionici* selected for the experiment, ATCC4965 was the best in terms of total productivity and cell yield, which values were 0.29g total acids/L/h and 0.26 g dry cell/g glucose, respectively.

서 론

프로피온산 박테리아는 산업적 공정에서 비타민 B₁₂, 효소 생산뿐 아니라 제설제 및 제초제, 방향제 생산에 이용되어 왔으며, 또한 dairy industry에서 swiss cheese의 특별한 맛과 모양의 개발에 중요한 역할을 하고 있다. 이들 박테리아의 이점은 프로피온산 자체가 미생물의 발육을 저지하기 때문에 오염을 줄일 수 있고 또한 혐기성 조건하에서 세포 성장을 하므로 많은 에너지를 필요로 하지 않으며, 기질에 대한 편해 정도가 적어 거의 모든 당을 소화해 낼 수 있다.^{1,2)} 프로피온산 박테리아들은 dicarboxylic pathway를 거쳐 프로피온산을 생성한다. 일단 섭취된 글루코스는 해당작용(EMP, HMP pathway)을 거쳐 lactate로 분해된 후, 다시 pyruvate와 succinate를 거쳐 propionate로 전환되며, 동시에 acetate도 함께 생성이 된다.

초산과 프로피온산 등 유기산은 석유의 정제과정에서 분리된 올레핀 가스를 원료로 하여 제조하고 있으며, 연간 생산량은 미국의 경우 약 140만 톤에 이르고 있다. 유기산은 현재까지 석유나 천연가스 등 화석원료에만 의지해 왔으나 이러한 합성 유기산은 가격이 비쌀 뿐 아니라 그 많은 수요를 조달하기에는 양이 충분치 않은 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 유기산 생산을 위해 미생물을 이용한 발효 공정을 통해 *Propionibacterium acidipropionici*의 발효 특성을 연구하여 유기산 대량 생산을 위한 기초자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 최적 성장 조건

유기산을 생성하는 박테리아 균주로서 *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, 4965, 25562 등 세 균주를 미국 ATCC사에서 구입하였다. 박테리아의 최적 성장조건을 알아보기 위해 pH, Peptone(Acumedica Inc), Yeast extract (Difco Lab.)의 factor로 실험하였다. 250mL 삼각플라스크에서 Uni Thermo Shaker(EYELA NTS-1300)를 이용하여 배양하였으며, pH가 떨어질 때마다 1-2hr 간격으로 3.0N NaOH를 사용하여 수작업으로 pH를 조절하였다.

회분식 발효

발효용 배지로는 glucose 30g/l, peptone 15g/l, yeast extract 0.75g/l, K₂HPO₄ 0.25g/l, KH₂PO₄ 0.2g/l, MnSO₄ 0.05g/l를 사용하였다. Bench-Top Fermenter System(Virtis. Co)를 사용하여 온도 및 교반 속도를 조절하고 3.0N NaOH의 자동 주입으로 적정 pH를 유지하며, 또한 N₂가스를 간헐적으로 주입하여 혐기성 상태를 유지하였다.

결과 및 고찰

균주의 최적 성장 조건

Peptone, Yeast extract 주입량에 따른 발효 실험으로, 대체로 주입량이 증가함에 따라 총 유기산 생산량이 20.4~31.7g acids/L(peptone), 17.4~31.1g acids/L(yeast extract)로 증가 경향을 보였으나 peptone과 Yeast extract의 가격과 유기산 생산성을 고려해 볼 때 최적 함량이 각각 1.5%, 0.75%로 나타났다(Figure 1). 또한 pH에 따른 발효 실험 결과, 총 유기산 생산량은 11.5~26.5g acid/L로 pH 5.0에서 가장 낮았으며 pH 5.5~7.5에서 가장 높아 최적 pH 범위로 선정되었다.

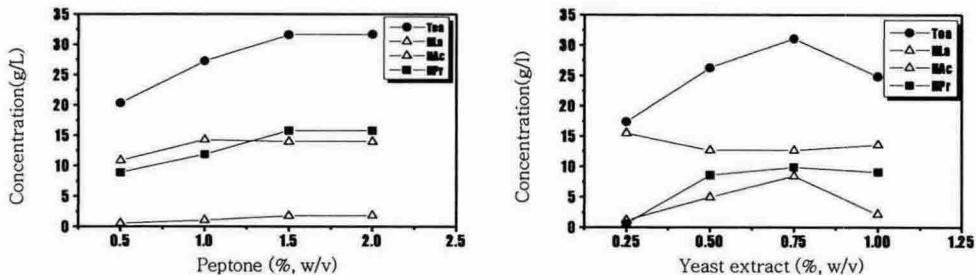


Figure 1. Organic acid production according to nutrient condition by strain of *P.acidipropionici* ATCC 25562. (37°C, pH7.0, glucose 30g/L)

●-Total acids, △-Lactic acid ▲-Acetic acid, ■-Propionic acid

균주별 회분식 발효

환경제어 회분식 발효기에 의한 발효 실험을 통해 *P.acidipropionici* 균주의 pH6, 7에서의 발효 특성을 비교하여 보았다. ATCC 25562, 4875, 4965 세 균주 모두 대체로 글루코스가 다 소모된 시간에 젖산의 농도가 최고에 달한 후 점차 소비되어 프로피온산과 아세트산으로 전환된 것을 볼 수 있다(Figures 2-4). 최적 pH와 우수 균주의 선정을 위해 Table 1에서 pH에 따른 균주간의 생산성을 비교 분석하여 보았다. 최종 유기산 생산율 및 생산성이 대체로 pH6.0에서 더 높은 것으로 나타났으며, 균주간의 생산성을 비교해 본 결과 ATCC25562 균주가 0.94g total acid/ g sugar로 유기산 생산율은 가장 높지만 발효에 소모되는 시간이 220hr 이상으로 ATCC4875, ATCC4965 균주에 비해 대사 속도가 2배 이상 늦어 유기산 생산성이 상당히 떨어짐을 알 수 있었다. ATCC4965 균주에서는 최대 유기산 생산성이 0.29 g total acid/L/h로 유기산 생산 효율이 가장 높은 것으로 판명되었다.

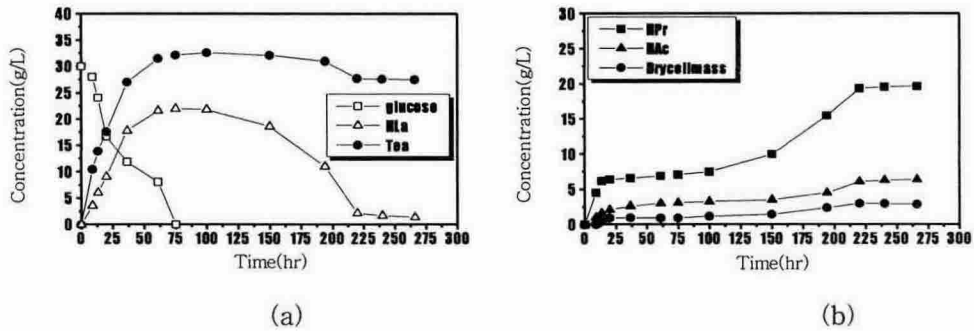


Figure 2. Organic acids production by batch fermentation of *P. acidipropionici* ATCC 25562. (37°C, pH6, glucose 30g/L)

- (a) glucose(□) and lactic acid(△) consumption, Total acids production(●)
 (b) organic acids(■-propionic, ▲-acetic) and cellmass(○) production

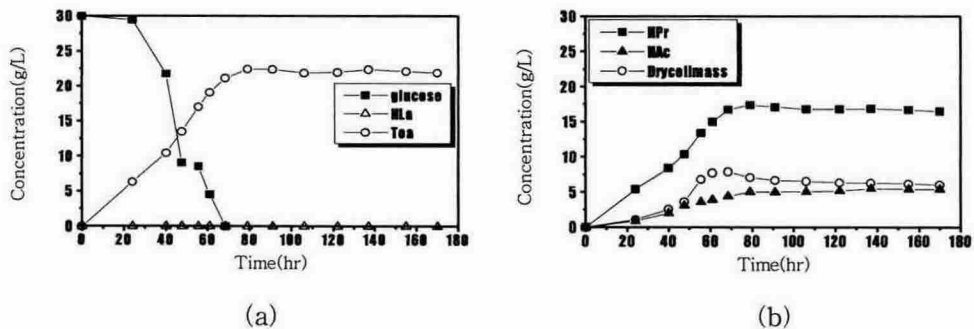


Figure 3. Organic acids production by batch fermentation of *P. acidipropionici* ATCC 4965. (30°C, pH6, glucose 30g/L)

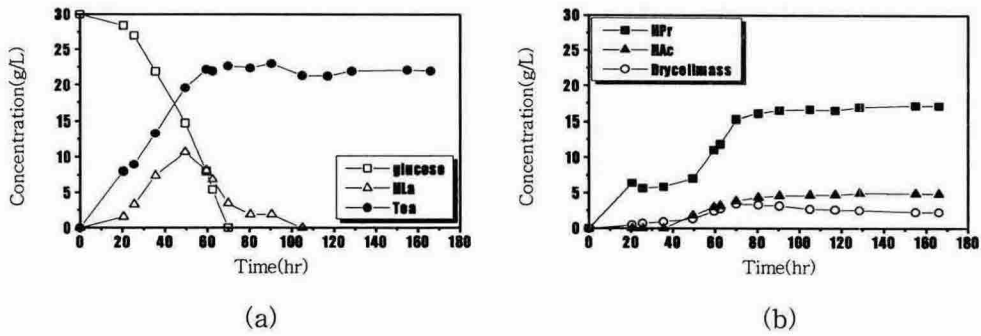


Figure 4. Organic acids production by batch fermentation of *P. acidipropionici* ATCC 4875. (30°C, pH6, glucose 30g/L)

Table 1. Performance comparisons in batch fermentation

	Strain(<i>P.acidipropionici</i>)					
	ATCC 25562		ATCC 4875		ATCC 4965	
pH	6	7	6	7	6	7
Total sugar(g/L)	30	30	30	30	30	30
Maximum cell Yield(g drycell/g glucose)	0.10	0.06	0.12	0.05	0.26	0.09
Acids Conc. (g/L)	Propionic		17.15		17.39	
	Acetic		4.93		5.05	
	Lactic		0		0	
	Total Acid production		22.08		22.44	
Product Yield(g total acid/g sugar)	0.94	0.83	0.74	0.74	0.75	0.64
Maximum Productivity(g total acid/L/h)	0.13	0.11	0.28	0.22	0.29	0.26

요 약

유기산 생산을 위한 *Propionibacterium acidipropionici*의 발효 특성을 규명하기 위하여 ATCC 4965, 4875, 25562의 세 균주를 선별하였다. 세포 성장에 따른 발효 실험에서는 Peptone, Yeast extract, pH별로 실시되었으며, 각각 1.5%, 0.75%, 5.5-7.5에서 유기산 생산성이 최적으로 나타났다. 회분식 발효결과 세 균주 모두 pH 6.0에서 유기산 수율과 생산성이 pH 7.0에 비해 더 높았으며, 그 중에서도 *P.acidipropionici* ATCC4965균주가 유기산 생산성이 0.29g total acids/L/h로 가장 우수한 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Sheng-Tsiung Hsu and Shang-Tian Yang, "Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: Effect of pH"(1981), *Biotechnol.*, **38**, 571-578.
2. Carrondo, M.J.T., J.P.S.G. Crespo, and M.J. Mora, "Production of propionic acid using a xylose utilizing *Propionibacterium*"(1988). *Biochem*, **17**, 295-312.